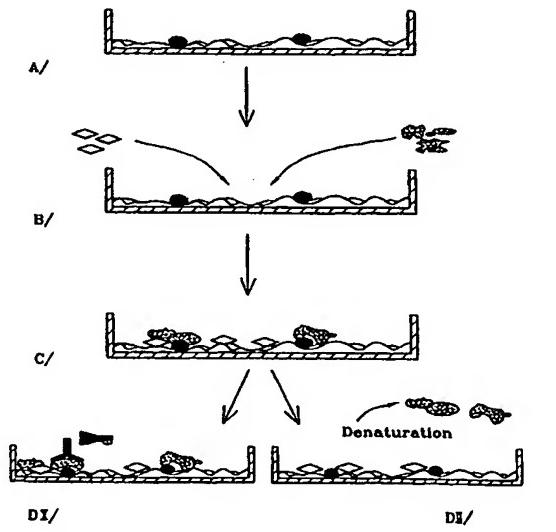




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/49080 (43) Date de publication internationale: 30 septembre 1999 (30.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00691 (22) Date de dépôt international: 25 mars 1999 (25.03.99)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 98/04064 26 mars 1998 (26.03.98) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SOCIETE FRANÇAISE DE RECHERCHES ET D'INVESTISSEMENTS (S.F.R.I.) [FR/FR]; Berganton, F-33127 Saint Jean d'Illac (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SALLES, Bernard [FR/FR]; 4, rue Compans, F-31500 Toulouse (FR). CALSOU, Patrick [FR/FR]; 37, rue des Avions, F-31400 Toulouse (FR). LI, Ruo-Ya [FR/FR]; 25, avenue d'Occitanie, F-31520 Ramonville Sainte Agne (FR).			
(74) Mandataire: POUCHUCQ, Bernard; Cabinet Thebault, 111, cours du Médoc, F-33300 Bordeaux (FR).			
(54) Title: METHOD FOR DETECTING DAMAGED DNA USING PROTEIN COMPLEXES AND ELEMENTS FOR IMPLEMENTING SAID METHOD			
(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE LESIONS DE L'ADN AU MOYEN DE COMPLEXES DE PROTEINES ET ELEMENTS PERMETTANT LA MISE EN OEUVRE DU PROCEDE			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a method for qualitatively and quantitatively detecting DNA lesions comprising the following different steps: preparing DNA; subjecting said DNA to damaging treatment; and fixing said damaged DNA on a sensitised solid support; or preparing DNA; fixing said non-damaged DNA on a sensitised solid support; and subjecting said DNA to damaging treatment; or treating cells; lysis and capture of cell DNA. The invention is characterised in that it consists in: treating said damaged DNA with a composition comprising a cell extract or a purified protein having at least an activity for recognising and/or repairing lesions; and detecting on the damaged DNA, directly or indirectly, the presence of the proteins recognising and/or repairing the resulting lesions; a washing step intervening between all the different steps. The invention also concerns the elements for implementing said method.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'objet de l'invention est un procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur l'ADN comprenant les différentes étapes suivantes: préparation de l'ADN; traitement endommageant cet ADN, et fixation de cet ADN lésé sur un support solide sensibilisé, ou préparation de l'ADN; fixation de cet ADN non lésé sur un support solide sensibilisé, et traitement endommageant l'ADN, ou traitement des cellules lyse et capture de l'ADN cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste à: faire agir sur cet ADN lésé une composition comprenant au moins un extrait cellulaire ou une protéine purifiée possédant au moins une activité de reconnaissance et/ou de réparation des lésions, et à détecter sur l'ADN lésé, directement ou indirectement, la présence des protéines de reconnaissance et/ou de réparation des lésions produites, toutes les étapes étant séparées par au moins une étape de lavage. L'invention concerne aussi les éléments pour la mise en oeuvre de ce procédé.</p>			



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**PROCEDE DE DETECTION DE LESIONS DE L'ADN AU MOYEN DE
COMPLEXES DE PROTEINES ET ELEMENTS PERMETTANT LA MISE EN
OEUVRE DU PROCEDE**

La présente invention concerne un procédé de détection de modifications structurales de l'ADN en utilisant le complexe lésion/protéines de reconnaissance et/ou de réparation.

L'invention couvre aussi les éléments permettant la mise en oeuvre 5 dudit procédé.

Pour la suite de la description, et pour les revendications, on appelle :

- "produit lésant", tout agent chimique pur spécifique, tout mélange artificiel d'agents chimiques, ou toute composition naturelle d'agents chimiques ou encore, tout agent physique tel que les rayonnements, notamment les rayonnements ionisants et ultraviolets, tout agent biologique tel que virus et protéines exogènes.
- "support sensibilisé" : tout support notamment solide ayant été traité par des substances présentant une très forte affinité pour les acides nucléiques (ADN ou ARN) ;
- "extrait cellulaire" : tout extrait cellulaire partiellement purifié, protéines naturelles ou produites par génie génétique, purifiées ou non.

On sait que l'ADN, support de l'information génétique, peut être lésé par des processus métaboliques endogènes, tels que l'alkylation ou l'oxydation 20 des bases, mais plus particulièrement par tout agent génotoxique exogène

(xénobiotique, agents physiques et chimiques) ayant des conséquences évidentes sur la viabilité cellulaire si les lésions ne sont pas réparées.

Outre la mort cellulaire induite par ces génotoxiques, un processus de mutagenèse peut être induit ou résulter d'une mauvaise réparation des lésions.

- 5 L'apparition de mutants est susceptible d'entraîner un dysfonctionnement cellulaire et, en particulier, d'initier un développement tumoral.

Il est donc important d'analyser et de détecter toute modification structurale de l'ADN qui peut être à l'origine de mutations. La détection de lésions peut concerner des préparations d'ADN purifiées et traitées *in vitro* par
10 un agent génotoxique mais aussi l'ADN cellulaire provenant de tissus prélevés par biopsie ou d'organismes entiers ou de cellules en culture *in vitro* ou *ex vivo*, après traitement par tout agent génotoxique.

Ainsi, dans l'industrie du médicament, on peut avoir besoin de déterminer qualitativement et quantitativement soit le pouvoir génotoxique,
15 soit le potentiel protecteur vis à vis d'un effet génotoxique, d'un composé ou d'un mélange de composés. De plus, on peut s'intéresser aux capacités de réparation des lésions suite à un traitement génotoxique dans un type cellulaire donné. Une telle détermination est utile pour des cellules en culture, ou bien isolées *ex vivo*. Des applications de ce type de détermination sont par exemple
20 la détection de xénobiotiques génotoxiques, le suivi de patients traités par chimiothérapie, ou bien le suivi de personnes travaillant en milieu pollué par des substances génotoxiques.

On connaît différents tests concernant l'ADN, et notamment la demande de brevet EP 0.472.482, qui concerne le dosage de microquantités d'ADN
25 extracellulaire présent dans un liquide biologique, notamment dans le plasma sanguin.

On connaît, par la demande de brevet français N° 95 03230, un procédé pour déterminer la présence de lésions d'ADN à partir d'un signal de réparation. Ce procédé utilise l'étape de synthèse réparatrice qui survient après
30 toute excision d'une lésion présente dans l'ADN.

Cette synthèse, aussi appelée UDS (Unscheduled DNA Synthesis) a été utilisée pour détecter au niveau cellulaire après incorporation de nucléotides

marqués dans l'ADN endommagé et réparé, la présence de lésions sur l'ADN, ainsi que l'activité de réparation des cellules étudiées. Cette synthèse réparatrice a été d'autre part utilisée dans un test décrit par Wood et col. (Cell 1988, 53, 97-106), qui utilisait deux plasmides purifiés, de tailles différentes,

5 l'un endommagé, l'autre non endommagé, en tant que référence, incubés en présence d'un extrait cellulaire purifié. En présence d'une concentration déterminée de dNTP, d'ATP et de magnésium, la réaction d'excision des lésions a pu être reproduite en totalité, allant de la reconnaissance, en passant par l'incision-excision resynthèse jusqu'à la ligation. Après purification, et

10 séparation des ADN plasmidiques sur gel d'agarose, la radioactivité incorporée dans les plasmides endommagés et les plasmides contrôlés peut être mesurée après autoradiographie du gel d'agarose. Le pourcentage de lésions ainsi réparées in vitro par ce mécanismes est de l'ordre de 5 %.

L'activité d'incision-excision peut être directement mesurée par

15 modification de l'essai décrit ci-dessus suivant un protocole publié par les auteurs du présent brevet (Calsou et Salles, 1994, Biochem. Biophys. Res. Com., 202, 788-795 et Calsou et Salles, 1994, Nucleic. Acid Res., 22, 4937-4942). Le procédé utilisé pour détecter des lésions de l'ADN à partir du signal de réparation décrit dans la demande de brevet français précitée N°95 03230,

20 utilise la propriété des extraits de réaliser les étapes de réparation, et permet de détecter ces lésions à partir du signal obtenu lors de l'étape de resynthèse qui suit l'excision. Ce procédé comprend les différentes étapes suivantes :

- préparer l'ADN, par une méthode qui consiste :
 - soit à fixer de l'ADN cible sur un support solide sensibilisé, puis à soumettre cet ADN à l'action d'au moins un agent lésant,
 - soit à soumettre les cellules directement à l'action d'un produit lésant, à lyser ces cellules dans une solution, puis à fixer l'ADN sur un support solide sensibilisé,
- soumettre cet ADN lésé fixé à l'action réparatrice d'un extrait cellulaire, cet extrait comprenant un marqueur,
- révéler directement ou indirectement l'incorporation de ce marqueur dans l'ADN réparé.

Dans le but de se soustraire à toute condition biochimique dépendant de la synthèse d'ADN, d'améliorer la sensibilité de détection, d'obtenir d'autres informations sur le système de réparation qui prend en charge les lésions étudiées, d'élargir la gamme de lésions d'ADN détectables, on utilise la 5 capacité des protéines de reconnaissance et/ou de réparation, d'interagir avec tout type de lésion.

En effet, le test, selon la présente invention, utilise des protéines capables de reconnaître des lésions produites *in vitro* sur de l'ADN purifié ou bien à partir de cellules isolées *ex vivo*, avec une sensibilité accrue, une 10 possibilité d'étudier en première approximation le système de réparation mis en jeu, une plus large gamme de lésions détectées et également un gain de temps important.

En effet, la détection qualitative et quantitative selon l'invention, s'effectue au niveau de la première étape de reconnaissance, et non pas sur 15 l'étape de synthèse réparatrice. Les conditions d'interaction entre les protéines et l'ADN lésé peuvent donc ainsi être optimisées sans tenir compte des paramètres biochimiques requis pour l'ensemble de la réaction de réparation.

On connaît à ce jour au moins une dizaine de protéines adaptées à ce type de fonction dans le cadre de l'excision de nucléotides, au moins autant 20 pour ce qui concerne l'excision de base, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la reconnaissance des cassures de l'ADN.

Le procédé selon la présente invention comprend les étapes suivantes :

- préparation de l'ADN,
- traitement endommageant cet ADN, et
- 25 - fixation de cet ADN lésé sur un support solide sensibilisé,
ou
 - préparation de l'ADN,
 - fixation de cet ADN non lésé sur un support solide sensibilisé, et
 - traitement endommageant l'ADN,
- 30 - ou
 - traitement des cellules ,
 - lyse et capture de l'ADN cellulaire,

et se caractérise en ce qu'il consiste à :

- faire agir sur cet ADN lésé une composition comprenant soit un extrait cellulaire possédant au moins une activité de reconnaissance et/ou de réparation des lésions, soit une protéine purifiée avec un spectre de reconnaissance connu, et
- à détecter sur l'ADN lésé, directement ou indirectement, la présence des protéines de reconnaissance et/ou de réparation des lésions produites,

Toutes les étapes étant séparées par au moins une étape de lavage si 10 nécessaire.

Plus particulièrement le procédé de détection qualitative et quantitative de lésions, se caractérise en ce qu'il consiste à détecter directement sur l'ADN lésé les protéines de réparation ou toute autre construction de reconnaissance à l'aide d'anticorps ou de systèmes de marquage et à révéler par 15 chimioluminescence les complexes formés.

Les anticorps comprennent des anticorps primaires et secondaires.

Un premier mode de mise en oeuvre consiste à détecter les protéines liées à l'ADN lésé par un premier anticorps spécifique suivi d'une révélation de type ELISA utilisant un second anticorps couplée à une activité enzymatique 20 (par exemple HRP) permettant une quantification en luminescence.

On peut aussi détecter dans le surnageant la présence des protéines de réparation après séparation sur gel et immunoblotting et/ou à étudier la diminution de concentration de ces protéines en fonction d'un nombre croissant de lésions sur l'ADN.

25 Une variante utilisable pour des lésions connues consiste à utiliser directement une protéine purifiée de réparation et/ou de reconnaissance spécifique et à détecter par la technique ELISA à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine puis d'un anticorps secondaire couplé à une activité enzymatique

30 De façon préférentielle, le support solide est une plaque de microtitration à puits, ou bien tout système utilisant des billes, afin d'augmenter la surface de capture de l'ADN, et la sensibilité de détection.

On sensibilise le support solide par des substances présentant une très forte affinité vis à vis de l'ADN, de façon à provoquer une fixation de cet ADN par adsorption. Ces substances sont choisies parmi les substances cationiques ou les protéines, au pH utilisé pour l'adsorption du matériel nucléique.

5 Les substances cationiques sont choisies parmi les polyacides aminés de type polylysine ou polyarginine, lévogyres, dextrogyres ou lévogyres/dextrogyres. Dans le cas de la polylysine, son poids moléculaire retenu se situe dans la fraction 15 000 à 30 000 Daltons.

La sensibilisation du support est réalisée par incubation en tampon 10 phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM et un pH compris entre 6,5 et 8, plus particulièrement 7.

De façon préférentielle, l'ADN adsorbé est de l'ADN génomique obtenu après lyse de cellules traitées ou non traitées par un agent génotoxique.

L'invention couvre aussi les éléments nécessaires à la mise en oeuvre du 15 procédé, c'est à dire :

- des ADN modifiés,
- l'extrait cellulaire proficient pour toutes les activités de détection et/ou réparation de cet ADN lésé,
- les tampons d'incubation et de lavage, et

20 - la microplaqué sensibilisée par adsorption d'ADN plasmide et cellulaire.

En outre, les éléments peuvent comprendre des tampons de lysé pour d'une part la désorption des complexes, et d'autre part la lyse des cellules lorsque la détection est menée sur de l'ADN cellulaire après endommagement.

L'invention est maintenant décrite en regard des dessins annexés sur 25 lesquels :

- la figure 1 représente une vue schématique des étapes du procédé selon le mode principal et une variante,
- la figure 2 représente une vue des rapports de réparation,
- la figure 3 représente l'immunoréactivité de deux protéines de réparation,

30

- la figure 4 représente un diagramme du rapport de réparation obtenu avec un extrait cellulaire purifié en fonction de différents types d'agents lésants,
- la figure 5 représente un diagramme des résultats obtenus par le 5 procédé selon l'invention,
- la figure 6 représente un diagramme identique à celui de la figure 5, mais avec une protéine différente,
- la figure 7 représente un diagramme des résultats obtenus par le 10 procédé selon l'invention en considérant la détection des cassures de l'ADN, et
- la figure 8 représente un diagramme des résultats obtenus par le procédé selon l'invention en considérant la détection des cassures simple-brin de l'ADN.

Sur la figure 1, le mode principal qui comprend les étapes A, B C et D1, 15 correspond à la détection directe par la technique ELISA d'un complexe protéines de réparation/lésions, avec détection en chimioluminescence.

La variante D2 montrée aussi sur la figure 1, requiert des étapes additionnelles et elle est principalement utilisée pour contrôler les résultats obtenus par la réaction en D1. Cette variante correspond à la succession 20 d'étapes suivantes : désorption des protéines de reconnaissance et/ou de réparation de la microplaqué, séparation en gel PAGE SDS, transfert sur membranes de nitrocellulose, puis détection par la technique d'immunoblotting.

On a représenté une étape A qui consiste à fixer sur un support 25 sensibilisé de l'ADN d'origine plasmidique purifié et traité pour générer des lésions ou bien de l'ADN cellulaire, provenant de cellules traitées par des agents génotoxiques directs ou indirects, puis lysés à l'aide d'un tampon de lyse.

On peut citer un exemple de tampon de lyse cellulaire dit LB qui 30 comprend au moins :

- 10 mM de tampon phosphate
- 10 % d'urée

- 1 % de détergent
- 10 mM EDTA, pH8
- 100 µg/ml Rnase A
- H₂O distillée.

5 L'ADN est ensuite immobilisé directement et sans purification sur le support comme cela est décrit dans la demande de brevet français N° 95 03230.

Le support peut être une plaque de microtitration à puits ou tout autre support mettant en oeuvre des billes afin d'augmenter la surface de capture de
10 l'ADN et donc la sensibilité de détection dans un volume réactionnel le plus faible possible.

Le support est saturé pendant au moins 15 minutes à 30°C avec une solution tampon phosphate saline, PBST, à laquelle on ajoute 0,025 % de sérum albumine bovine acétylée.

15 Au cours de l'étape B, le support est utilisé dans une réaction de réparation qui consiste en une incubation en présence d'extraits cellulaires purifiés, pendant deux heures à 30°C pour donner un exemple, en présence entre autres d'une composition connue de dNTP.

Pendant l'étape de réparation, un des nucléotides utilisé est modifié, par
20 exemple le biotine-21-dUTP, et celui-ci est incorporé en biotin-11-dUMP pendant l'étape de synthèse réparatrice.

La quantité incorporée de dUMP modifié est fonction de l'activité de réparation et peut être détectée par chimioluminescence, ainsi qu'il a été décrit dans la demande de brevet français N° 95 03230.

25 L'objet de l'étape C est non plus de détecter la présence de dUMP biotinylé avec l'extravidine, mais de déterminer sur le même support, les protéines présentes sur les lésions qui sont spécifiques de la réparation.

Dans le cas de l'étude de l'activité réparatrice, on obtient des résultats, ainsi qu'il est mentionné en figure 2, c'est à dire les capacités de réparation de
30 l'ADN en fonction du temps, suivant le nombre de lésions produites par la lumière ultraviolette.

Ainsi, la figure 2 représente une vue de rapports de réparation, signal obtenu pour le plasmide endommagé divisé par le signal obtenu pour le plasmide contrôle non traité, ceci en fonction d'une part du temps d'incubation de la réaction, et d'autre part du nombre de lésions produites sur l'ADN par la 5 lumière ultraviolette, et ce pour 3 doses différentes d'irradiation.

La réparation est conduite dans les conditions normales : température 30°C, 150 µg d'extrait cellulaire purifié, 40 ng de plasmide traité ou non traité, adsorbés sur le support.

La figure 3 représente l'immunoréactivité de deux protéines de 10 réparation qui ont été choisies comme références pour la reconnaissance des lésions ultraviolettes de l'ADN :

- XPA, protéine intervenant dans la reconnaissance des lésions, et
- p62, protéine du facteur de transcription TFIIH, intervenant dans le complexe de préincision.

15 La présence de ces protéines est suivie à l'aide d'anticorps spécifiques sur le plasmide traité et non traité, dans les conditions de la réaction de la figure 2, après deux heures d'incubation avec les plasmides traités à 3 doses différentes d'irradiation en lumière ultraviolette.

On constate la corrélation attendue entre le nombre de lésions présentes 20 par plasmides et le nombre de molécules de protéines de réparation intervenant dans les étapes précoces de la réaction d'excision de nucléotides.

Selon la présente invention, on utilise une approche différente de celle de la synthèse réparatrice.

En effet, le procédé selon l'invention consiste soit à :

25 a) déterminer directement par immunodétection dans le support, le taux de protéines de réparation et/ou de reconnaissance interagissant spécifiquement avec des lésions produites sur l'ADN, étape D1 de la figure 1.

Dans ce mode principal de détermination, on choisit un anticorps primaire spécifique, et on incube celui-ci sous agitation. Cet anticorps est par 30 exemple dirigé contre la protéine XPA, ou bien contre la protéine p62, et dilué dans une solution de PBS et de BSA selon le titre de l'anticorps utilisé. Les supports sont ensuite lavés à l'aide d'une solution de PBST, puis on procède à

l'incubation d'un anticorps secondaire conjugué par exemple avec la peroxydase et dilué en fonction de l'anticorps utilisé. Les supports sont de nouveau lavés. La révélation et la quantification sont réalisées par chimioluminescence.

5 ou

b) à déterminer le taux de protéines après avoir réalisé une étape de désorption dans une solution adaptée, et à détecter par immunoblotting sur filtre de nitrocellulose. Cette étape D2 de la figure 1 sert en quelque sorte de contrôle de la réaction D1 qui est d'une utilisation beaucoup plus facile et
10 automatisable.

Par exemple, la désorption des protéines de réparation est réalisée en utilisant un tampon DB : 62,5 mM tris-HCl, pH 6,8 4M urea, 10 % glycérol, 2 % SDS, 5 % β -mercапto-ethanol, 0,003 % bleu de bromophenol. Cette étape dure 30 minutes environ à 30°C, sous agitation. Ces protéines sont ensuite
15 dénaturées par passage à la chaleur, 80°C pour fixer l'ordre de grandeur pendant 20 mn, et ensuite agitation 5 mn à 30°C. Plus particulièrement la détection par immunoblotting est réalisée par une électrophorèse SDS-PAGE qui permet de séparer les protéines en fonction de leurs tailles, et de révéler, après transfert sur membranes, les protéines d'intérêt en présence d'anticorps
20 spécifiques. Les complexes obtenus sont révélés comme précédemment par luminescence.

La figure 4 représente un diagramme du rapport de réparation obtenu avec un extrait cellulaire purifié en fonction de différents types d'agents lésants.

25 Les modifications produites par la lumière UVC et le CDDP sont reconnues par le système d'excision de nucléotides, alors que celles induites par le MMS sont reconnues par le système d'excision de base.

Quel que soit l'agent lésant, un rapport de réparation est obtenu signifiant la présence de lésions sur l'ADN, ainsi qu'il avait déjà été obtenu par
30 le procédé de quantification de synthèse réparatrice de l'art antérieur.

Sur les figures 5 et 6, on montre que lorsque les protéines testées appartiennent au système d'excision de nucléotides, comme le sont XPA et -

TFIIH-p62, celles-ci sont bien retrouvées lorsque les lésions sont reconnues par ce système, par exemple lésions par la lumière UVC ou le CDDP, mais ne sont pas retrouvées lorsque l'ADN est lésé par un agent qui induit des modifications non reconnues par la réparation par excision de nucléotides, MMS par 5 exemple.

Ces résultats indiquent la spécificité de la réaction de réparation, et on obtiendra une image inverse si l'on utilise des anticorps dirigés contre des glycosylases spécifiques des agents alkylants, lesquels donneront un signal avec l'utilisation de plasmides lésés par le MMS par exemple, alors qu'elles ne 10 donneront aucun signal lorsque le plasmide sera lésé par la lumière UVC ou le CDDP.

Sur les figures 7 et 8, on montre que l'on peut détecter les protéines associées plus spécifiquement aux cassures double-brin ou simple-brin dans l'ADN. Ainsi, une réactivité vis à vis du complexe Ku70/Ku80 indique la 15 présence de cassures double-brin alors que la réactivité vis à vis de la protéine poly-ribose polymérase, PARP, indique la présence de cassures simple-brin dans l'ADN.

Outre la simplicité et la sensibilité de détection de protéines de réparation, selon l'anticorps utilisé, on peut discriminer le système de 20 réparation impliqué dans la réparation de lésions inconnues, et ainsi orienter les conclusions de l'étude vers la nature chimique probable de la lésion.

Une autre approche consiste à utiliser non pas des extraits de cellules possédant toutes les activités de réparation, mais des cellules déficientes dans l'un des systèmes, par exemple des cellules provenant de patients atteints de 25 xeroderma pigmentosum, lesquelles sont déficientes dans les étapes précoces d'excision de nucléotides.

Par exemple, en utilisant des extraits provenant de cellules XPA, on n'obtient aucun signal avec l'anticorps XPA, puisque cette protéine n'est pas produite par la cellule, mais on n'obtient également aucun signal avec 30 l'anticorps TFIIH-p62 puisqu'il faut d'abord concrétiser l'étape de reconnaissance par XPA. En effet cette étape de reconnaissance est nécessaire à la fixation des autres protéines du complexe de réparation.

On peut réaliser des expérimentations avec des mutants du système d'excision de base, ou des mutants d'autres protéines de réparation de lésions telles que des cassures de l'ADN simple ou double-brin.

Une autre approche consiste à utiliser une protéine purifiée présentant
5 un spectre de reconnaissance spécifique de certaines lésions de l'ADN.

La conception même de cet essai montre son extrême flexibilité, et adaptabilité à partir du moment où l'on dispose des anticorps d'intérêts, les études pouvant être croisées avec des extraits cellulaires provenant de mutants déficients dans telle ou telle activité de réparation, ou avec des
10 protéines purifiées et/ou recombinantes présentant une affinité vis-à-vis d'une lésion ou d'une gamme de lésions spécifiques dans l'ADN.

L'invention a également pour objet l'ensemble des éléments nécessaires pour la mise en oeuvre de ce procédé, ces éléments pouvant être avantageusement regroupés dans un contenant adapté pour des facilités de
15 commercialisation.

Ainsi parmi les éléments nécessaires, on trouve les anticorps primaires et secondaires, la nature des anticorps primaires pouvant varier suivant l'étude envisagée. Ainsi dans le cas des éléments de base, il est prévu de fournir des anticorps dirigés contre une protéines de réparation du système d'excision de
20 nucléotides, système reconnaissant la quasi-totalité des modifications de l'ADN.

Dans un cas plus spécifique, il est prévu des anticorps dirigés contre certaines protéines avec un spectre de reconnaissance plus étroit que sont les glycosylases ou des protéines de reconnaissance des cassures de l'ADN.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur l'ADN comprenant les différentes étapes suivantes :

- préparation de l'ADN,
- traitement endommageant cet ADN, et
- 5 - fixation de cet ADN lésé sur un support solide sensibilisé,
ou
 - préparation de l'ADN,
 - fixation de cet ADN non lésé sur un support solide sensibilisé, et
 - traitement endommageant l'ADN,

10 ou

- traitement des cellules,
- lyse et capture de l'ADN cellulaire,

caractérisé en ce qu'il consiste à :

- faire agir sur cet ADN lésé une composition comprenant au moins un extrait cellulaire ou une protéine purifiée possédant au moins une activité de reconnaissance et/ou de réparation des lésions, et
- à détecter sur l'ADN lésé, directement ou indirectement, la présence des protéines de reconnaissance et/ou de réparation des lésions produites,

20 toutes les étapes étant séparées par au moins une étape de lavage.

2. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter directement sur l'ADN les protéines de réparation ou tout autre construction de reconnaissance à l'aide d'anticorps ou de systèmes de marquage et par révélation des 25 complexes formés par chimoluminescence.

3. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions de la revendication 2, caractérisé en ce que les anticorps comprennent des anticorps primaires et secondaires.

4. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les protéines liées à l'ADN lésé après désorption des complexes par analyse de type immunoblotting.
5. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter dans le surnageant la présence des protéines de réparation après séparation sur gel et immunoblotting.
6. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la
10 revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter dans le surnageant la présence des protéines de réparation et à étudier la diminution de concentration de ces protéines en fonction d'un nombre croissant de lésions sur l'ADN.
7. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon l'une
15 quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on utilise comme support solide, une plaque de microtitration à puits, ou tout système utilisant des billes, afin d'augmenter la surface de capture de l'ADN et la sensibilité de détection.
8. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon l'une
20 quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on sensibilise le support solide par des substances présentant une très forte affinité vis à vis de l'ADN, de façon à provoquer une fixation de cet ADN par adsorption.
9. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendications 8, caractérisé en ce qu'on choisit les substances parmi les
25 substances cationiques ou les protéines, au pH utilisé pour l'adsorption du matériel nucléique.
10. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on choisit les substances cationiques parmi les polyacides aminés de type polylysine ou polyarginine, lévogyres,
30 dextrogyres ou lévogyres/dextrogyres.

11. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon la revendication 10, caractérisé en ce que, dans le cas de la polylysine, on retient un poids moléculaire situé dans la fraction 15 000 à 30 000 Daltons.

12. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon
5 l'une des quelconques revendications 9, 10 ou 11, caractérisé en ce qu'on réalise la sensibilisation du support par incubation en tampon phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM et un pH compris entre 6,5 et 8, plus particulièrement 7.

13. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions selon
10 l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ADN adsorbé est de l'ADN génomique obtenu après lyse de cellules traitées ou non traitées par un agent génotoxique.

14. Eléments pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- 15 - des ADN modifiés,
 - l'extrait cellulaire proficient pour toutes les activités de détection et/ou réparation de cet ADN lésé, ou bien une protéine purifiée de réparation et/ou de reconnaissance,
 - les tampons d'incubation et de lavage, et
20 - la microplaqué sensibilisée pour l'adsorption d'ADN plasmide ou cellulaire.

15. Eléments selon la revendication 14, caractérisés en ce qu'ils comprennent en outre des tampons de lyse pour d'une part la désorption des complexes, et d'autre part la lyse des cellules lorsque la détection est menée
25 sur de l'ADN cellulaire après endommagement.

1/6

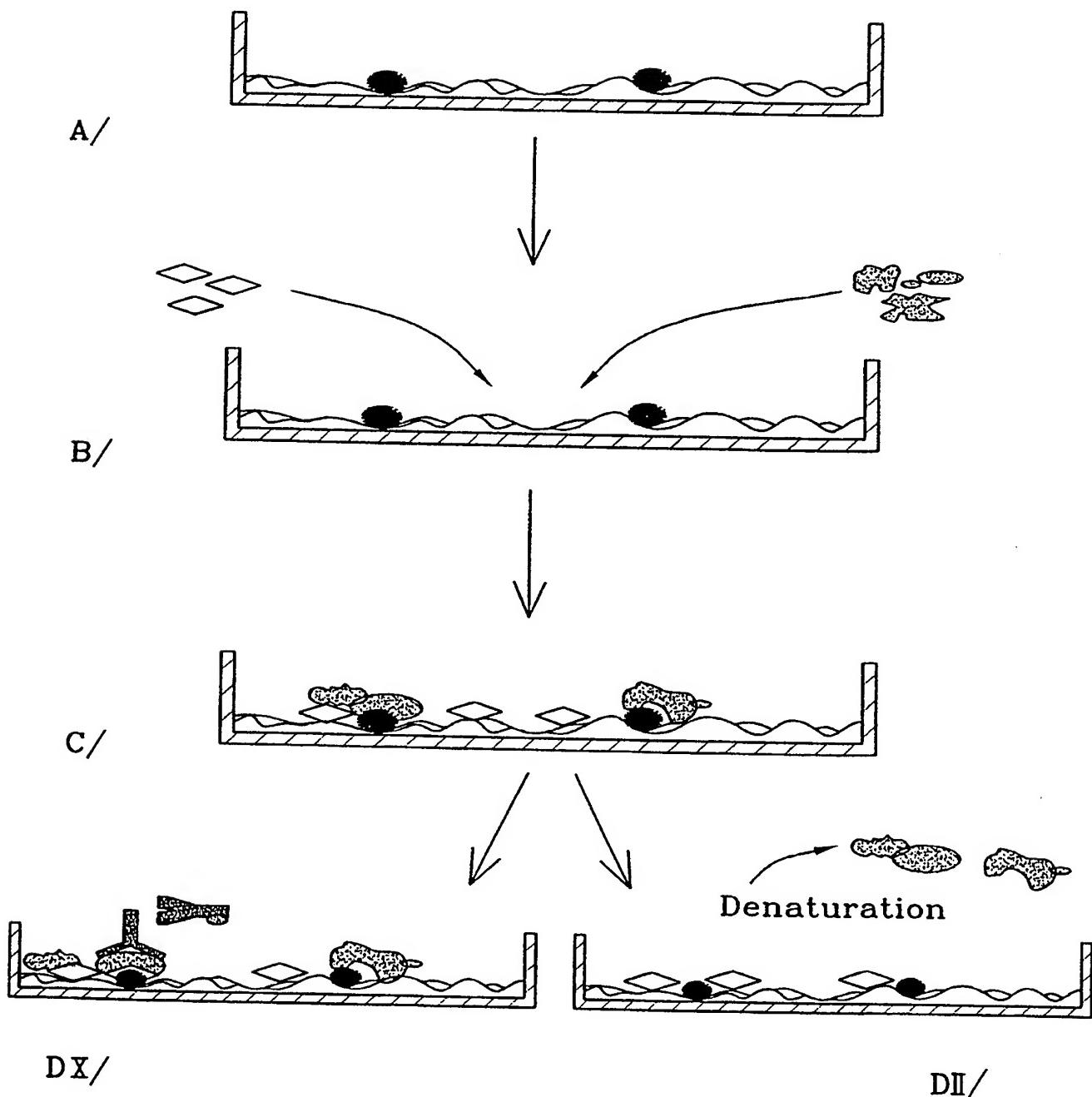


FIG.1

2/6

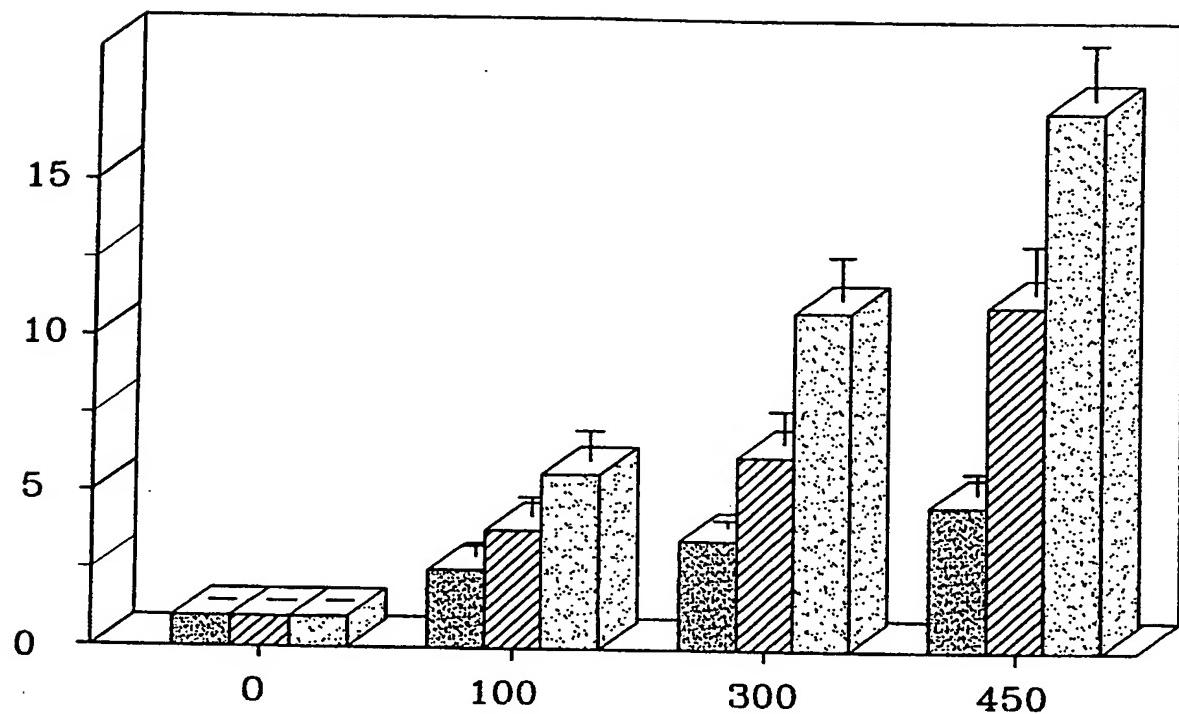


FIG.2

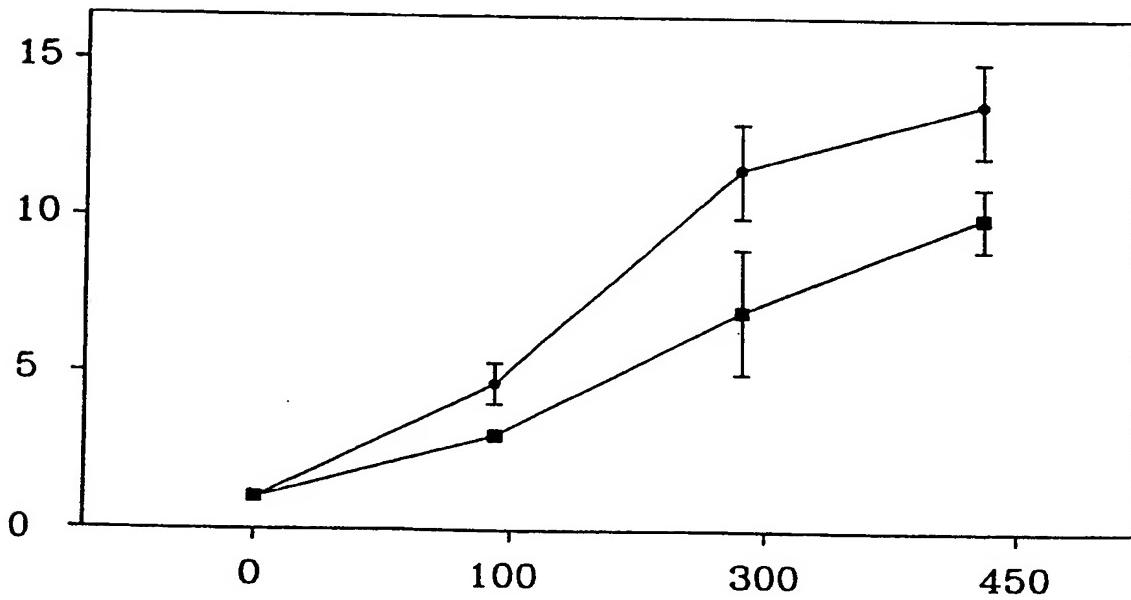


FIG.3

3/6

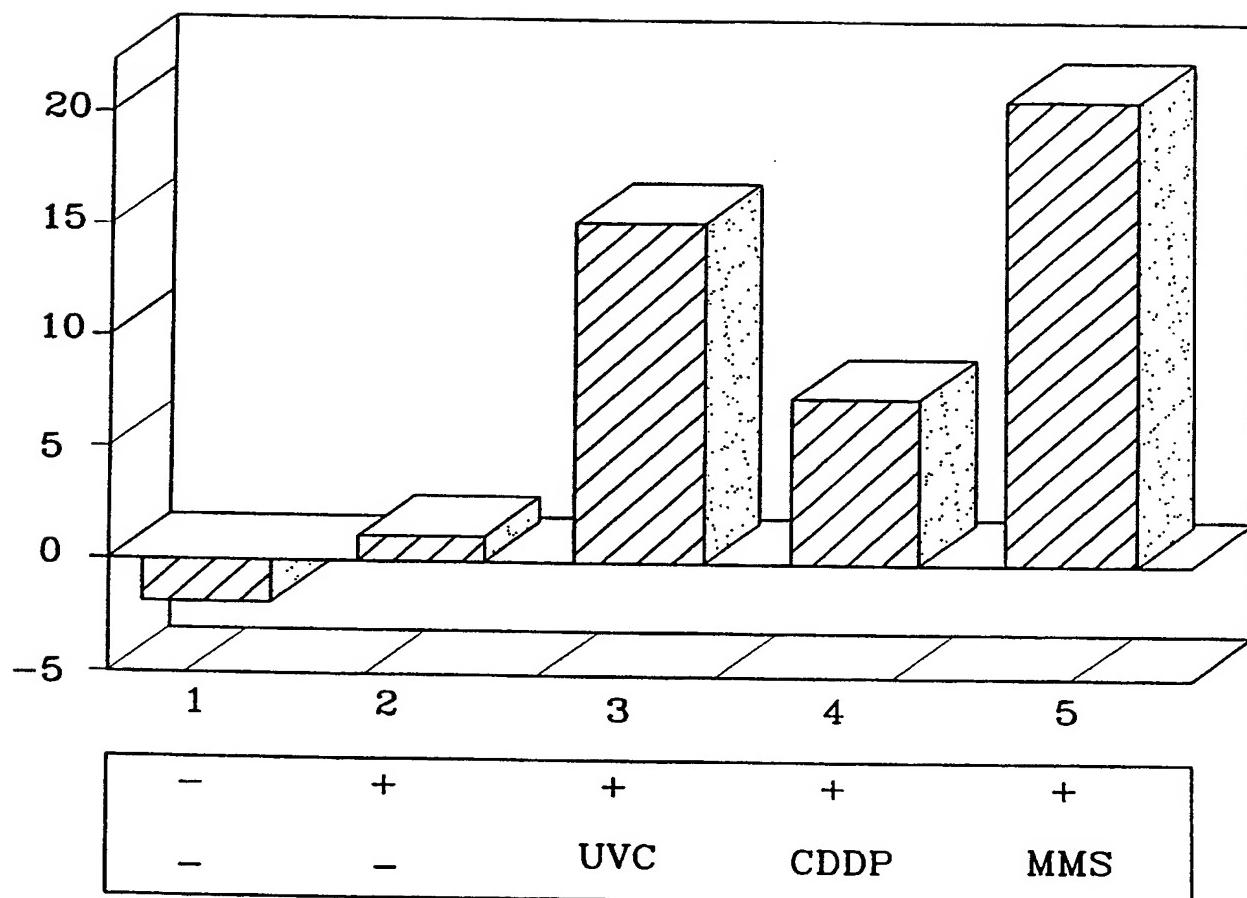
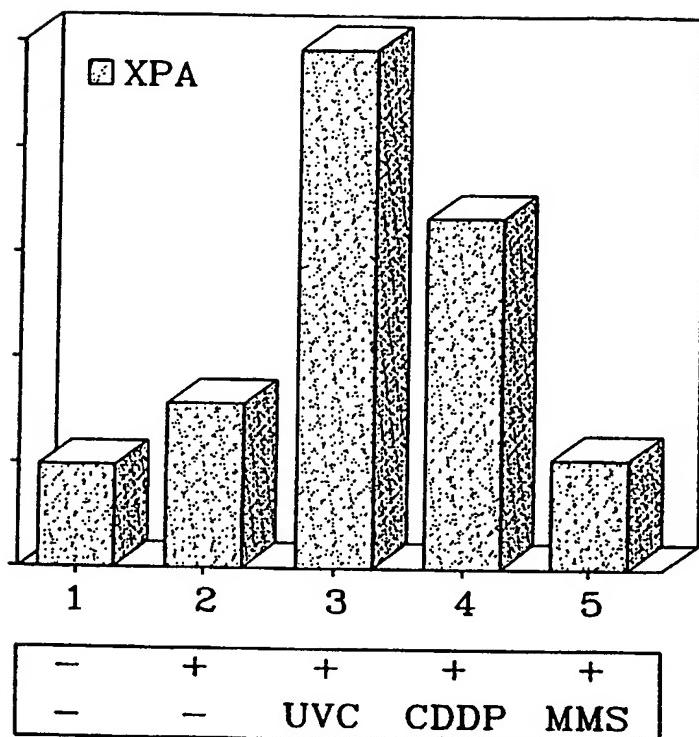
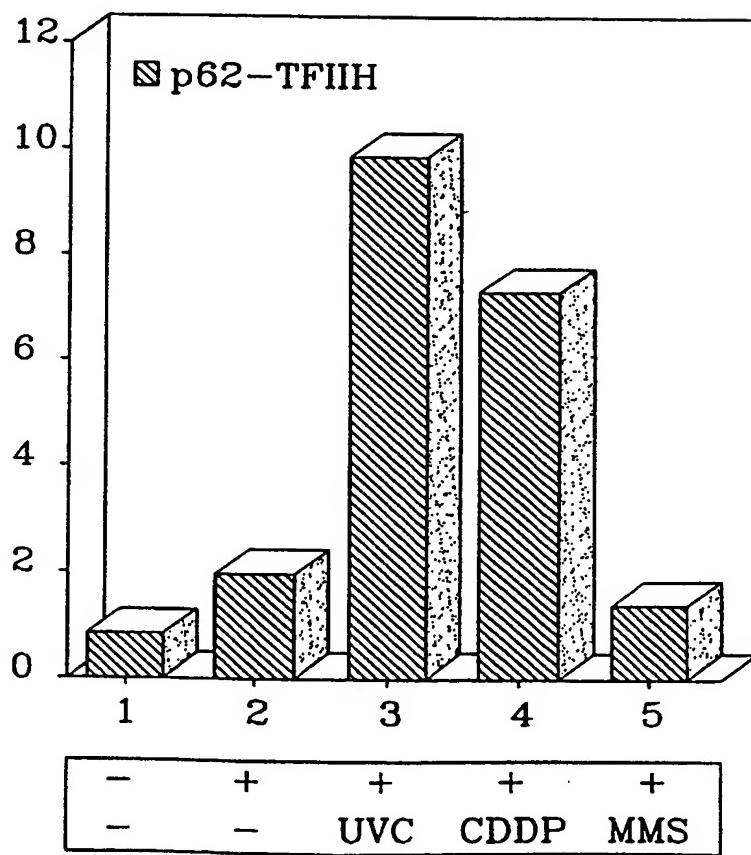


FIG.4

4 / 6

**FIG.5****FIG.6**

5 / 6

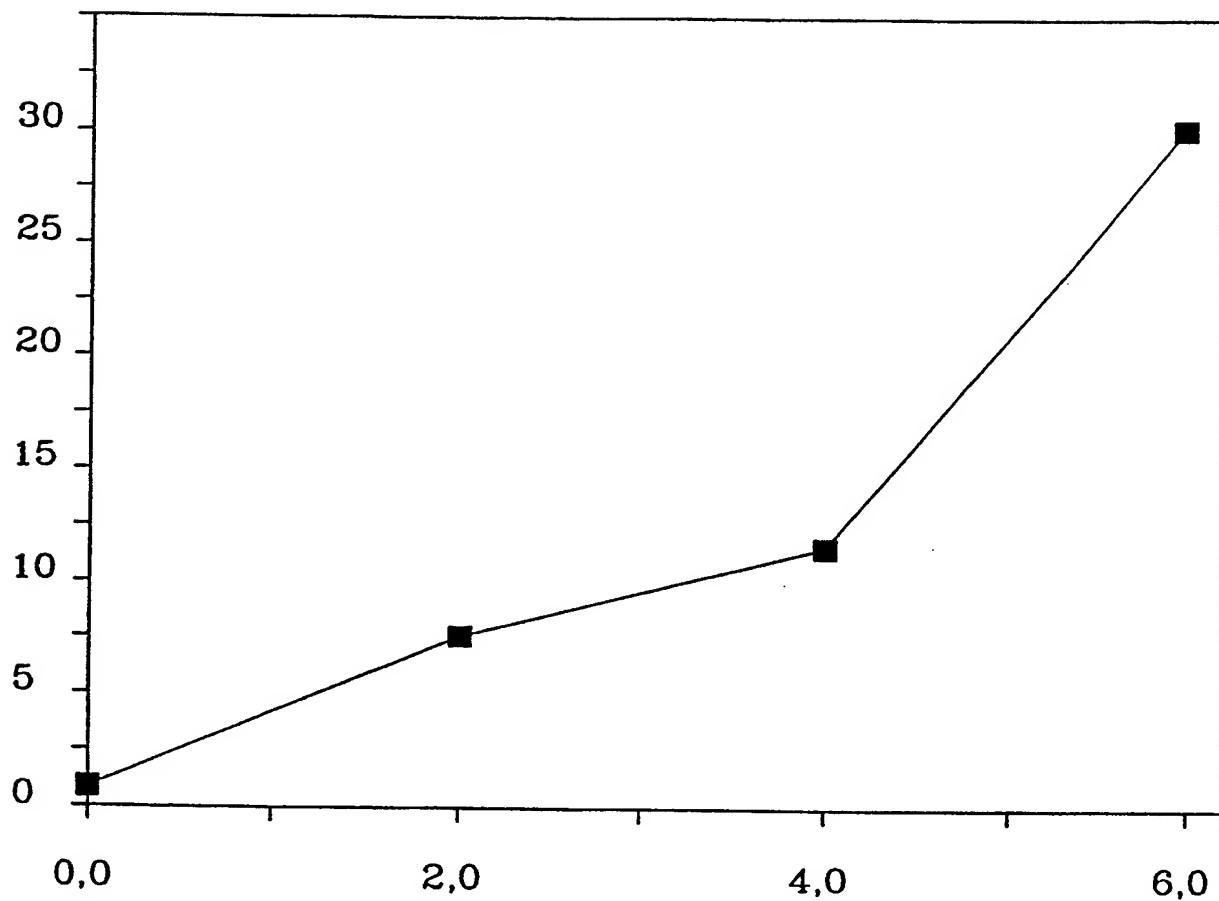


FIG.7

6/6

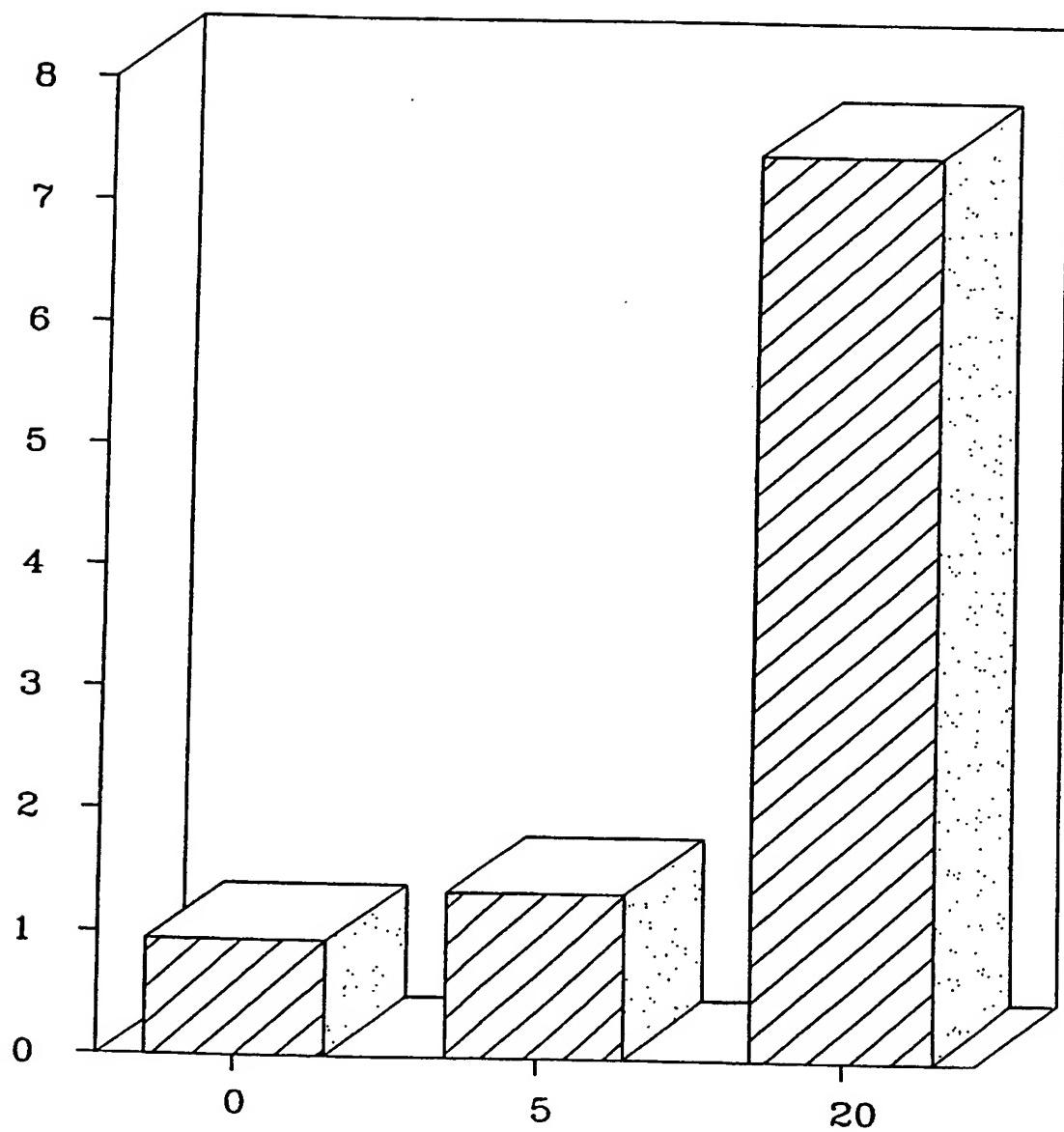


FIG.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

-nal Application No

PCT/FR 99/00691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK M. S. ET AL.,: "Ultraviolet-induced movement of the human DNA repair protein, Xeroderma pigmentosum type G, in the nucleus" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, - August 1996 (1996-08) pages 8368-8373, XP002087082 see m & m, fig. 2	1-4
Y	---	7-15
Y	WO 96 28571 A (RECH INVESTISSEMENT SOC FR DE ; PROVOT CHRISTIAN (FR); SALLES BERNAR) 19 September 1996 (1996-09-19) see claims	7-15
A	WO 96 41192 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 19 December 1996 (1996-12-19) see claims	1-15
	---	-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 July 1999	29/07/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 24837 A (APPLIED GENETICS INC) 9 December 1993 (1993-12-09) ---	1-15
X	SALLES B ET AL: "A CHEMILUMINESCENT MICROPLATE ASSAY TO DETECT DNA DAMAGE INDUCED BY GENOTOXIC TREATMENTS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 232, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 37-42, XP002054956 ISSN: 0003-2697 the whole document ---	1-15
P, X	WO 98 53099 A (CHAUBRON FRANCK ;GENOLIFE (FR); PROVOT CHRISTIAN (FR)) 26 November 1998 (1998-11-26) the whole document ---	1-15
P, X	FRIT P. ET AL., : "Ku70/Ku80 protein complex inhibits the binding of nucleotide excision repair proteins on linear DNA in vitro" J. MOLECULAR BIOLOGY, vol. 284, no. 4, - 11 December 1998 (1998-12-11) pages 963-973, XP002109336 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 99/00691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9628571 A	19-09-1996	FR	2731711 A		20-09-1996
		AU	5008996 A		02-10-1996
		CA	2215493 A		19-09-1996
		EP	0815260 A		07-01-1998
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 9641192 A	19-12-1996	AU	6254396 A		30-12-1996
		CA	2223971 A		19-12-1996
		EP	0845104 A		03-06-1998
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 9324837 A	09-12-1993	US	5407804 A		18-04-1995
		EP	0642664 A		15-03-1995
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 9853099 A	26-11-1998	FR	2763600 A		27-11-1998
		AU	7775198 A		11-12-1998
-----	-----	-----	-----	-----	-----